

Molekular-Ökologische und Genomische Studien zur Charakterisierung von nicht-kultivierten Archaea und Acidobacteria

vom Fachbereich Biologie der
Technischen Universität Darmstadt
zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte

DISSERTATION

vorgelegt von

Torsten Ochsenreiter

aus Darmstadt

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Mikrobiologie, TU Darmstadt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Ulrich Göringer
Mikrobiologie, TU Darmstadt

Eingereicht am: 19.12.2002

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2003

Darmstadt 2003
D17

Die vorliegende Arbeit wurde als Promotionsarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Darmstadt im Labor von von Frau Dr. Christa Schleper in der Abteilung von Frau Prof. Felicitas Pfeifer im Zeitraum von Oktober 1999 bis Dezember 2002 angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich den materiellen Inhalt vorliegender Arbeit ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken und Fakten, sofern sie nicht wissenschaftliches Allgemeingut und nicht einzeln angebbarer allgemeiner Kenntnis sind, wurden als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 19. Dezember 2002

Torsten Ochsenreiter

Gutachter 1 : Frau Prof. Felicitas Pfeifer
Gutachter 2 : Herr Prof. H. Ulrich Göringer

"Nothing in biology makes sense except in the light of evolution".

Theodosius Dobzhansky, 1973.

Veröffentlichungen:

1.Ochsenreiter T. Selesi D., Quaiser A., Bonch-Ozmolovskaya L., Schleper C. (2003)
Diversity and Abundance of Crenarchaeota in Terrestrial Habitats studied by 16S RNA
Surveys and Real Time PCR
Environmental Microbiology (published online doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00476.x).

2.Quaiser A.#, Ochsenreiter T.#, Lanz C., Schuster SC., Treusch AH., Eck J., and
Schleper C. (2003)
Acidobacteria form a Coherent but Highly Diverse Group within the Bacterial Domain
Evidence from Environmental Genomics
Molecular Microbiology (in press)
These authors contributed equally to this work

3.Ochsenreiter, T., Pfeifer, F. and Schleper, C. (2002)
Diversity of Archaea in Hypersaline Environments characterized by Molecular-
Phylogenetic Studies and Cultivation approaches.
Extremophiles 6:267-274.

4.Quaiser A., Ochsenreiter T., Klenk HP., Kletzin A., Treusch AH., Meurer G., Eck J.,
Sensen CW. and Schleper C. (2002)
First Insight into the Genome of an Uncultivated Crenarchaeote from Soil.
Environmental Microbiology 4(10):603-611.

Priority-establishing EP-patent application: Quaiser A., Ochsenreiter T., Treusch AH.,
Schleper C., Lorenz P., Eck J., Isolation and cloning of DNA from uncultivated
organisms, Brain AG, Zwingenberg 2002.

A. Inhaltsverzeichnis	1
B. Zusammenfassung	4
C. Einleitung	5
1. Die Bedeutung der mikrobiellen Ökologie	5
2. Die 16S rRNA als Basis der modernen mikrobiellen Ökologie	5
3. Nicht-kultivierte <i>Archaea</i> in moderaten Habitaten	7
4. Von 16S-Diversitätsstudien zur Funktion	9
D. Ergebnisse	11
1. Vorstellung der untersuchten Habitate	11
2. Präparation der Umwelt-DNA	12
3. Auswahl der 16S rDNA-spezifischen Primer und Amplifikation von 16S rDNA Genfragmenten aus Umweltproben	14
3.1 Archaeale Primer	14
3.2 Bakterielle Primer	14
4. Klonierung und Restriktionsanalyse	15
5. Phylogenetische Analyse	16
6. Verbreitung von nicht-thermophilen <i>Crenarchaeota</i> in moderaten Habitaten	18
6.1 Verbreitung in Bodenhabitaten	18
6.2 Verbreitung in aquatischen Habitaten	19
6.3 Verbreitung in mikrobiellen Matten	19
7. Bakterielle Diversität	21
7.1 Diversität im Sandökosystem am Rotbühl	21
7.2 Diversität von <i>Acidobacteria</i> im Sandökosystem am Rotbühl (ROB) und einem benachbarten landwirtschaftlich genutzten Boden (SPA)	22
7.3 Bakterielle Diversität der mikrobiellen Matte MAL	22
8. Versuche zum Nachweis von <i>Archaea</i> in Umweltproben durch <i>in situ</i> -Hybridisierung	24
9. Quantifizierung der 16S rDNA von <i>Archaea</i> und <i>Acidobacteria</i> in Bodenproben	27

10. Charakterisierung genomischer Fragmente von nicht-kultivierten <i>Acidobacteria</i>	32
10.1 Identifizierung und Sequenzierung von <i>Acidobacteria</i> Genomfragmenten	32
10.2 Kriterien für die Analyse der <i>Acidobacteria</i> Genomfragmente	33
10.3 Analyse der <i>Acidobacteria</i> Genomfragmente	33
10.4 Analyse der colinearen Region zwischen den acidobakteriellen Genomfragmenten 41b15 und 23k22	38
10.5 Vergleich der Struktur des hypothetischen pur Operons von 23k22 und 41b15 mit der Anordnung in den Genomen 22 ausgewählter Mikroorganismen	39
E. Diskussion	44
1. Kritische Anmerkungen zur Nutzung der 16S ribosomalen-RNA als phylogenetischem Marker	44
2. Molekularökologische Studien von <i>Archaea</i> und <i>Acidobacteria</i>	45
2.1 Zellaufschluss und Auswahl der Oligonukleotide	45
2.2 PCR-Artefakte als mögliche Fehlerquellen in molekular-ökologischen Studien	46
3. Diversität von nicht-thermophilen <i>Crenarchaeota</i>	47
4. Verbreitung von <i>Archaea</i> in Süßwasserhabitaten	47
5. Anpassung von <i>Crenarchaeota</i> an mesophile Habitate	48
6. Verbreitung von <i>Archaea</i> in mikrobiellen Matten	48
7. Versuche zur Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	48
8. Quantitative <i>real time</i> -PCR zum Nachweis von archaealer 16S rDNA im Boden	49
9. 16S rDNADiversität von <i>Acidobacteria</i> in Bodenhabitaten und quantitative Abschätzungen durch <i>real time</i> -PCR	50
10. Vergleichende Analyse von <i>Acidobacteria</i> -Genomfragmenten	52
F. Material und Methoden	54
1. Material	54
1.1 Chemikalien	54
1.2 Mikroorganismen	55
1.3 Chromosomale DNAs und Fosmid-DNAs	55
1.4 Enzyme und Kits	55
1.5 DNA-Größenstandards	55
1.6 Medien	54
1.7 Allgemeine Puffer und Lösungen	56
1.8 Puffer und Lösungen für Southern-Analyse	56

2. Methoden	56
2.1 Probennahme und DNA Extraktion	56
2.2 Amplifikation von 16 rRNA-Genen und Restriktionsanalyse	56
2.3 DNA-Sequenzbestimmung	57
2.4 Phylogenetische Analyse	57
2.5 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	57
2.6 <i>Real time</i> -PCR Analyse	58
2.7 Erstellung einer Genbank mit 25 kb Inserts	59
2.8 Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden	59
2.9 Herstellung von Koloniefiltern	59
2.10 Filterhybridisierung	60
2.11 Waschen und Exposition	60
2.12 Sequenz-Annotation	60
2.13 Messung der Salzkonzentration in Umweltproben	60
 G. Literatur	 61
 H. Anhang	 66
1. Tabellen	66

B. Zusammenfassung

Molekular-ökologische Studien der letzten Jahre haben aufgezeigt, dass der weitaus größte Teil der Mikroorganismen, sogar über 99%, bis heute nicht charakterisiert wurde. Es wurden neue Phyla der *Archaea* und *Bacteria* entdeckt, deren ökologische Bedeutung noch völlig ungeklärt ist, weil keine dieser Organismen bisher kultiviert werden konnten. In den letzten Jahren wurden so auch in der Domäne der *Archaea* neue phylogenetische Gruppen, von bis jetzt nicht-kultivierten *Crenarchaeota* identifiziert, die aus moderaten, marinen und terrestrischen Habitaten stammten. Alle bislang kultivierten Vertreter dieses Phylums sind dagegen extrem Thermophile. Um einen umfassenden Überblick über die Verteilung und Diversität von nicht-thermophilen *Crenarchaeota* in moderaten Habitaten zu gewinnen, wurden in der vorliegenden Arbeit 13 unterschiedliche terrestrische und aquatische Habitate mittels 16S rDNA-basierter Methoden untersucht. In sechs verschiedenen Bodenproben wurde jeweils nur eine bestimmte Gruppe von *Crenarchaeota* nachgewiesen, im Gegensatz dazu war die Diversität der *Crenarchaeota* in Süßwasserhabitaten deutlich größer. Mit spezifischen Oligonukleotiden für nicht-thermophile *Crenarchaeota* wurde eine Methode etabliert, um 16S rRNA-Gene in einer Umweltprobe mittels *real time* PCR zu quantifizieren. Die relative Abundanz von *Crenarchaeota* im Boden des Sandökosystems am Rotbühl (ROB) wurde über diese Methode mit 0,5% bestimmt. In der Rhizosphäre des gleichen Habitats und in einem benachbarten landwirtschaftlich genutzten Boden stellten die *Crenarchaeota* 0,16% der gesamtprokaryotischen 16S rRNA Gene. Diese Daten zeigten, dass nicht-thermophile *Crenarchaeota* eine wenig diverse, aber stabile Population der Mikrobiota in verschiedenen Bodenhabitaten stellen.

Neben den nicht-thermophilen *Crenarchaeota* wurde auch die Diversität und Abundanz von *Acidobacteria*, einer dominanten *Bacteria* Gruppe, die bislang kaum charakterisiert ist, untersucht. *Acidobacteria* wurden als neues Phylum der *Bacteria* erst im Zuge der molekular-ökologischen Studien der letzten Jahre etabliert. In ihrer phylogenetischen Breite sind sie vergleichbar mit den sehr gut charakterisierten *Proteobacteria*. In den hier durchgeführten quantitativen Studien wurden *Acidobacteria* der

Gruppe V mit 8% als eine der dominanten Gruppen im Boden des Sandökosystems am Rotbühl nachgewiesen. Im benachbarten, landwirtschaftlich genutzten Boden stellten sie sogar 37% der bakteriellen Population. Aus einer komplexen Genbank, die genomische Fragmente der mikrobiellen Population des Sandökosystems enthielt, wurden sechs DNA-Fragmente mit insgesamt 210 kb analysiert. Diese Analyse bestätigte die postulierte große Diversität und Kohärenz der *Acidobacteria*. Insbesondere ein 22 kb großer, colinearer Bereich zwischen zwei Genomfragmenten mit einem hypothetischen Purin-Biosyntheseoperon wurde näher charakterisiert. Es konnte eine Hypothese über die Verwandtschaftsbeziehung von *Acidobacteria*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* abgeleitet werden. Diese Analysen stellen die ersten genomischen Informationen über *Acidobacteria* dar, einer Gruppe die äußerst abundant und ubiquitär in Böden vertreten ist, aber bislang noch völlig uncharakterisiert blieb.

C. Einleitung

1. Die Bedeutung der mikrobiellen Ökologie

Mit mehr als 3,8 Milliarden Jahren Evolution stellen die Prokaryoten die älteste und diverseste Gruppe von Organismen dar (Pace, 1997). Sie waren und sind auch die wichtigste für die Entwicklung unseres Planeten (King *et al.*, 2002). Mit der Produktion von Sauerstoff durch Cyanobakterien vor mehr als zwei Milliarden Jahren und der daraus entstandenen Ozonschicht wurde der Grundstein für die Entwicklung höheren Lebens gelegt (für einen Überblick siehe Kasting and Siefert, 2002). Auch heute atmen wir noch mit jedem Atemzug Gase, die von Mikroorganismen stammen. So werden vor allem wichtige, so genannte Treibhausgase, wie Methan oder Kohlendioxid, zu überwiegendem Anteil von Mikroorganismen produziert und konsumiert (Kasting and Siefert, 2002; King *et al.*, 2002). Somit sind Mikroorganismen nicht nur wichtige Quellen umweltrelevanter Substanzen, sie sind auch in vielen Fällen deren wichtigste Senken (King *et al.*, 2002). Nach neueren Schätzungen sind ca. 50% des Kohlenstoffs und 90% der Elemente Stickstoff und Phosphor dieses Planeten in Mikroorganismen gebunden (Whitman *et al.*, 1998). Erst das Verständnis der mikrobiellen Stoffkreisläufe im Zusammenspiel mit humanen Emissionen wird uns in die Lage versetzen, unerwünschten Veränderungen unseres Lebensraumes rechtzeitig begegnen zu können.

Eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der mikrobiellen Ökologie ist das Wissen um die Vielfalt der Mikrobengemeinschaften. Wo man in der makroskopischen Biologie mit mehr als einer Millionen beschriebenen Arten heute schon einen wesentlichen Schritt für eine umfassende Artenbeschreibung getan hat (Hammond, 1995), ist die Mikrobiologie noch nicht einmal am Anfang. Die 5000-6000 bisher beschriebenen *Bacteria* und *Archaea* stellen nur einen Bruchteil eines Prozentes der wirklichen Vielfalt dar (Pace, 1997; DeLong and Pace, 2001; Torsvik *et al.*, 2002). Die größten Reservoire an *Bacteria* und *Archaea* und damit wohl auch die größte Diversität von Mikroorganismen sind in den subterrestrischen ($2,5 \times 10^{30}$ Zellen) und submarinen ($3,5 \times 10^{30}$) Habitaten, sowie in Böden ($2,6 \times 10^{29}$) und Ozeanen ($1,2 \times 10^{29}$) zu finden (Whitman *et al.*, 1998).

Der Grund, warum die mikrobielle Ökologie, also die Forschung um die Zusammenhän-

ge zwischen Mikroorganismen und ihrer Umwelt, so viele Jahre ein Mauerblümchen-Dasein geführt hat, war das Fehlen von Techniken, eine mit dem bloßen Auge nicht sichtbare Organismengruppe in ihrem Habitat verfolgen zu können. Erst die Weiterentwicklung des Mikroskops durch Antoni van Leeuwenhoek nach 1665 ermöglichte es, Mikroorganismen direkt zu beobachten. Bis in die siebziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts waren Kultivierung und Mikroskopie im wesentlichen die einzigen Mittel, mikrobielle Diversität zu erforschen. Da bisher nur ein sehr geringer Anteil, der unter dem Mikroskop sichtbaren Mikroorganismen im Labor in Reinkultur wächst, lassen Kultivierungsstudien aber nur eine sehr begrenzte Aussage über die Diversität von Mikroorganismen zu (für einen Überblick siehe Staley and Konopka, 1985; Roszak and Colwell, 1987). Erst die Entwicklung kultivierungsunabhängiger, molekularer Methoden zur Erforschung der Phylogenie und Physiologie von Mikroorganismen hat neue Wege der qualitativen und quantitativen Beschreibung von mikrobiellen Gemeinschaften eröffnet.

2. Die 16S rRNA als Basis der modernen mikrobiellen Ökologie

Mit der Etablierung der 16S rRNA als phylogenetischem Markermolekül durch Carl Woese und seine Mitarbeiter (Woese and Fox, 1977) wurde eine erste Voraussetzung für die molekulare Ökologie und Phylogenie geschaffen. Carl Woese und seine Mitarbeiter hatten erkannt, dass sich die RNA der kleinen ribosomalen Untereinheit aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, der hohen Konservierung und moderaten Variabilität, bei gleichzeitiger Abwesenheit von lateralem genetischen Transfer, optimal als phylogenetisches Markermolekül eignet (Olsen and Woese, 1993). Aufbauend auf diese Entdeckung nutzten Carl Woese und seine Mitarbeiter die phylogenetische Information der 16S rDNA bzw. 18S ribosomalen RNA, um natürliche Verwandtschaftsbeziehungen aufzuklären und teilten das Organismenreich in die drei Domänen *Eukarya*, *Bacteria* und *Archaea* ein (Woese *et al.*, 1990). Heute werden in der molekularen Ökologie 16S rRNA-Gene mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion direkt aus

Umweltproben isoliert und die Verwandtschaft anschließend mit phylogenetischen Methoden rekonstruiert (Abb. 1). Diese Technik ermöglicht es, die Diversität von Mikroorganismen zu erfassen, ohne sie kultivieren zu müssen.

Molekular-phylogenetische Umweltstudien auf dieser Basis haben in den letzten 15 Jahren ein völlig neues Bild der bakteriellen und archaealen Biodiversität entworfen (DeLong, 1997). Viele neue Phyla innerhalb der *Bacteria* wie TM7, OP11, *termite group 1*, *marine group A* etc. wurden erst durch molekular-ökologische

Studien entdeckt (Abb. 2). Mehr als ein Drittel, nämlich 13 der 36 jetzt bekannten bakteriellen Phyla bestehen nur aus 16S rDNA-Sequenzen, die über Umweltstudien gewonnen wurden (DeLong and Pace, 2001). Innerhalb anderer Phyla stehen wenige kultivierte Vertreter einer großen Anzahl an Umweltsequenzen gegenüber (*Acidobacteria*, *Cytophaga*, *Verrucomicrobia*, *Planctomyces*). Insbesondere 16S rDNA-Sequenzen aus dem Phylum der *Acidobacteria* wurden in mehreren unterschiedlichen Studien nachgewiesen. Alle bisher veröffentlichten Untersuchungen über die bakterielle Diversität in Bodenhabitaten konnten Sequenzen aus diesem Phylum nachweisen. So fielen in einem ariden Gebiet Arizonas (USA) 51% der bakteriellen Sequenzen in die Gruppe der *Acidobacteria* (Dunbar *et al.*, 1999). In einem Pinienwaldboden (Arizona, USA) waren 55% und in einem landwirtschaftlich genutzten Boden (Noordoostpolder, Niederlande) 31% der 16S rDNA Klon eindeutig acidobakterieller Herkunft (Kuske *et al.*, 1997; Smit *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer Verteilung und der Dominanz liegt es nahe, in den *Acidobacteria* eine enorm wichtige mikrobielle Population zu sehen, die wahrscheinlich an bedeutenden Stoffkreisläufen in Bodenhabitaten beteiligt ist. Im Gegensatz zu ihrer potentiellen Bedeutung ist das Wissen über diese Mikroorganismengruppe sehr begrenzt. So existiert in den Datenbanken bisher lediglich eine Proteinsequenz, eine endo-1,4-beta-Xylanase von *Acidobacterium capsulatum*. Von den anderen beiden *Acidobacteria*, *Geothrix fermentans* und *Holophaga foetida*, existieren außer der 16S rRNA Sequenz keine weiteren genetischen Informationen. Zudem ist es unwahrscheinlich, dass *Geothrix fermentans* und *Holophaga foetida* eine bedeutende Rolle in den oberen Bodenschichten spielen, da es sich um strikt anaerobe Organismen handelt. Die *Acidobacteria* können aufgrund ihrer phylogenetischen Diversität, ihrer Verbreitung, sowie der Abundanz durchaus mit dem Phylum der *Proteobacteria* verglichen werden, aus dem es bereits über 1300 validierte Spezies und mehr als 100 Genomprojekte gibt.

Umweltstudien, die auf 16S rDNA basieren, ermöglichten erstmals die Auflösung der mikrobiellen Vielfalt auf „Spezies“-Niveau. So konnte auf der Basis umfangreicher 16S rDNA-Klonbibliotheken die Speziesdiversität in unterschiedlichen Bodenhabitaten modelliert werden (Dunbar *et al.*, 2002). Je nach Bodentyp erwar-

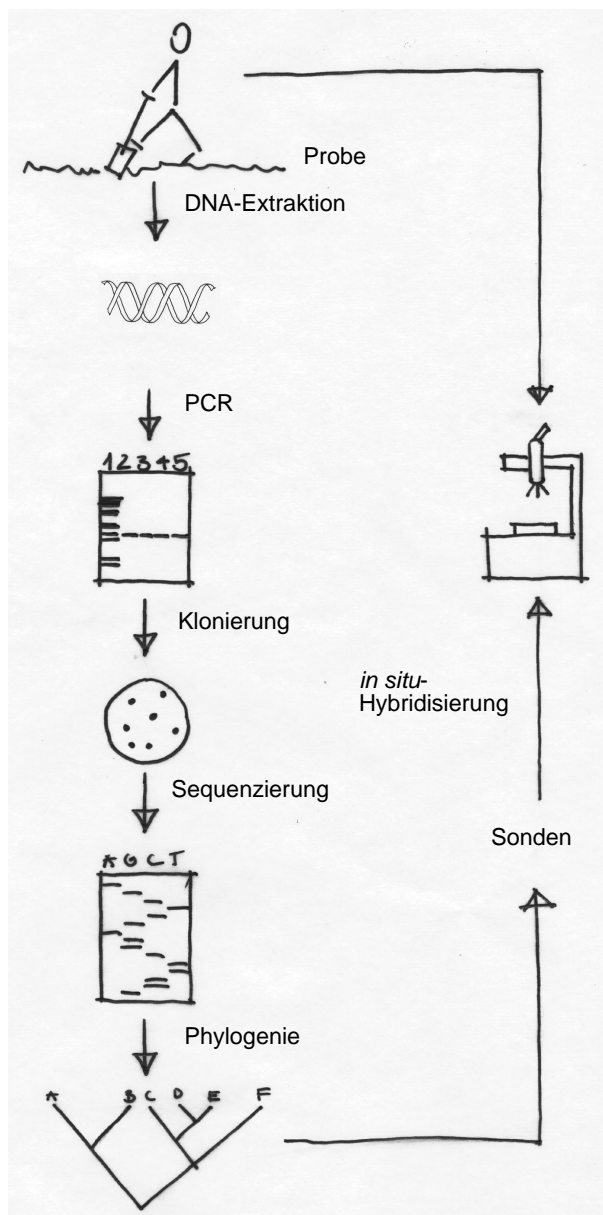


Abb. 1: Der sog. full-cycle-rRNA-Ansatz ermöglicht die Identifizierung und Charakterisierung von unbekannten, nicht kultivierten Mikroorganismen. Basierend auf den erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen können Sonden abgeleitet werden, die es ermöglichen, spezifisch bestimmte Mikroorganismen in der Ausgangsprobe zu visualisieren.

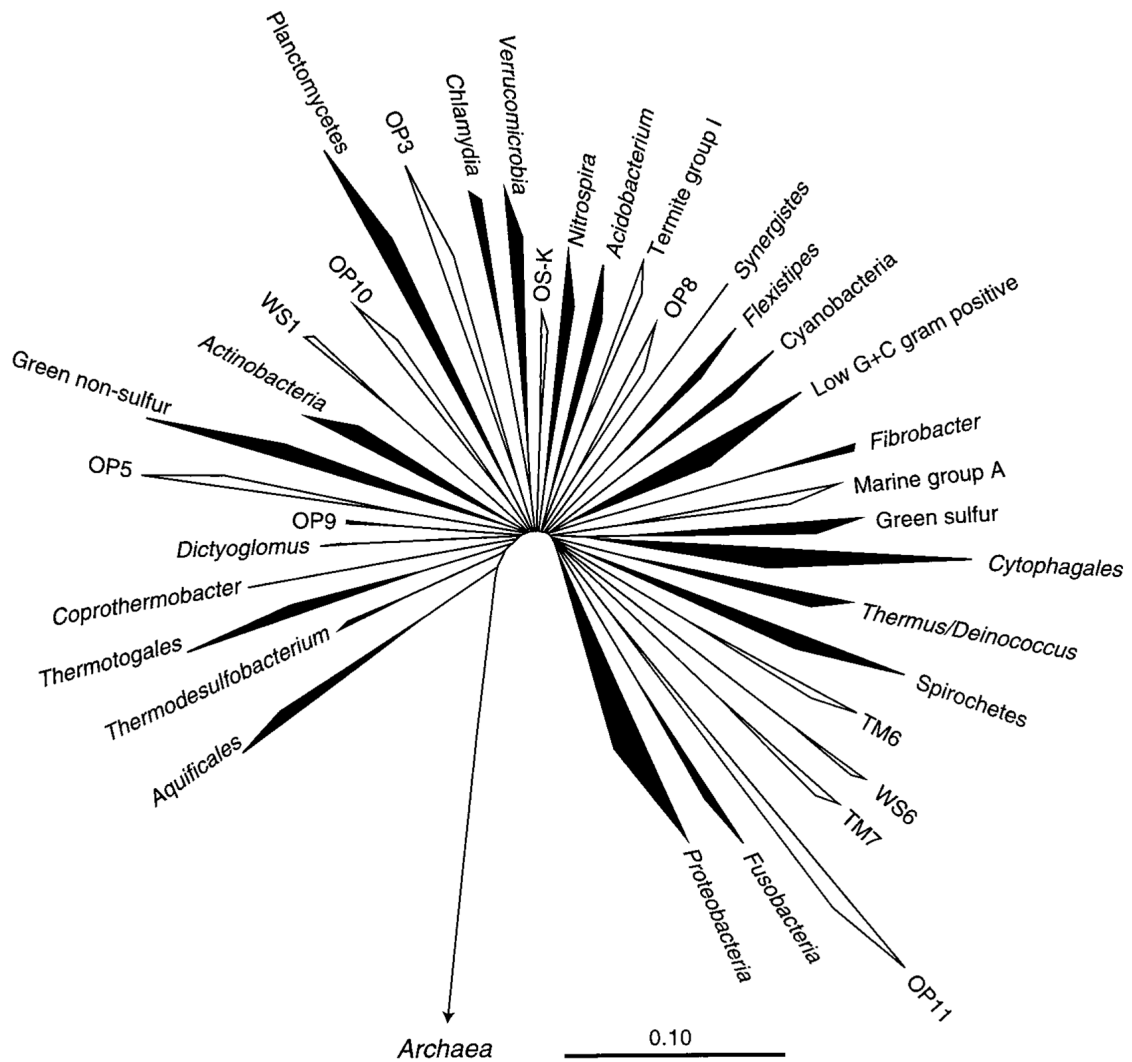


Abb. 2: Bakterielle Domäne mit 36 Phyla (Hugenholtz *et al.*, 1998). Gruppen mit kultivierten Vertretern sind in schwarz dargestellt. Gruppen, die nur durch Umweltsequenzen repräsentiert werden, sind in weiß gezeigt. Die Topologie des Baumes entspricht einer Neighbour Joining Analyse von 16S rRNA Sequenzen. Zwei oder mehr monophyletische Sequenzen wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und als Dreieck dargestellt. Die Länge des Dreiecks entspricht der phylogenetischen Tiefe der Verzweigungsordnung innerhalb dieser Gruppe. Die Breite entspricht der Anzahl der bekannten Sequenzen. Die Skalierung gibt 0,1 Austausch pro Nukleotid an.

tet man zwischen 3000 und 8000 unterschiedliche Spezies pro Gramm Probe. Diese Zahlen korrelieren gut mit anderen Studien, in denen die genetische Komplexität oder Genomgröße von mikrobiellen Gemeinschaften durch Reassoziationsstudien genomischer DNA bestimmt wurden. Solche Analysen haben gezeigt, dass sich die Genomgröße einer mikrobiellen Gemeinschaft in natürlichen organischen Böden im Bereich von 6000-11000 *Escherichia coli* Genomen bewegt (Torsvik and Ovreas, 2002).

3. Nicht-kultivierte *Archaea* in moderaten Habitaten

Viele molekular-ökologische Studien haben sich auf die Identifizierung und Diversität von Mikroorganismen aus der Gruppe der *Bacteria* konzentriert. Allerdings wurden insbesondere bei den *Archaea* auch spektakuläre Entdeckungen gemacht. Vor der Anwendung molekular-ökologischer Studien glaubte man, die Verbreitung von *Archaea* sei auf extreme oder strikt anaero-

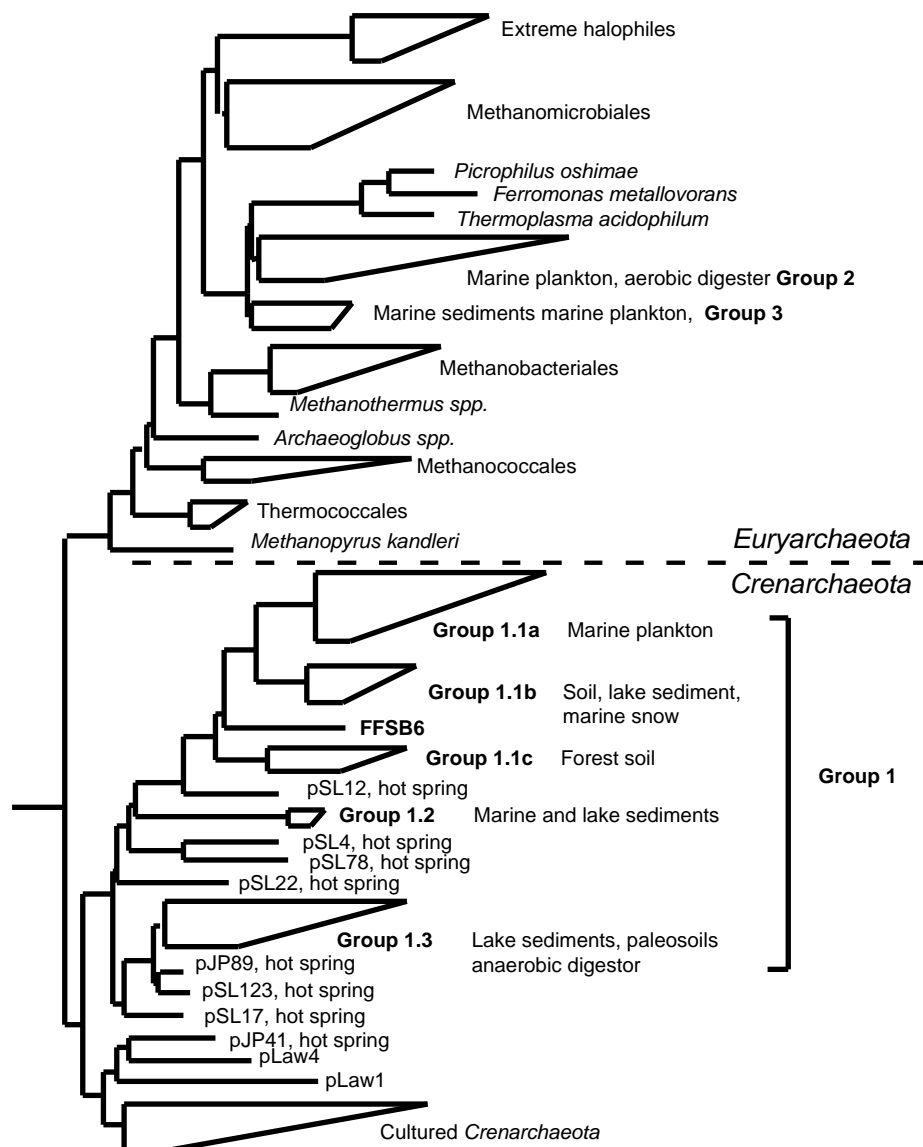


Abb.3: Phylogenetische Rekonstruktion der archaealen Domäne anhand der 16S ribosomalen RNA (DeLong, 1998). Gezeigt sind die beiden Königreiche innerhalb der *Archaea*, die *Euryarchaeota* und die *Crenarchaeota*. Gruppen, die nur durch Umweltklone repräsentiert werden, sind in Fettdruck.

be Habitate beschränkt. Dies schien logisch zu sein, sogar heute noch sind alle kultivierten *Euryarchaeota*, methanogene, halophile oder thermophile Organismen (Abb. 3). Aus der zweiten monophyletischen Gruppe der *Archaea*, den *Crenarchaeota*, wurden bis heute ausschließlich thermophile bis hyperthermophile Mikroorganismen kultiviert. Erstaunlicherweise konnten einige molekular-ökologische Studien der letzten Jahre zeigen, dass *Crenarchaeota* in vielen moderaten Habitaten vorkommen (DeLong, 1992; Fuhrman *et al.*, 1992; Bintrim *et al.*, 1997; Schleper *et al.*, 1997a). Edward DeLong gelang es, nicht-thermophile *Crenarchaeota* der Gruppe I im marinen Pikoplankton nachzuweisen

(DeLong, 1992; Abb.3). In der Folge wurden weitere nicht-thermophile *Crenarchaeota* 16S rRNA Sequenzen in marinen Invertebraten, (Preston *et al.*, 1996) und marinen Sedimenten entdeckt (Vetriani *et al.*, 1998; Vetriani *et al.*, 1999). Ebenso konnten 16S rDNA-Sequenzen von *Euryarchaeota* (Gruppe II) in unterschiedlichen Proben marinen Picoplanktons nachgewiesen werden (Fuhrman *et al.*, 1993; DeLong *et al.*, 1994; Massana *et al.*, 1997). Kürzlich gelang es mit molekular-ökologischen Methoden eine spezifische Assoziation zwischen methanogenen *Euryarchaeota* und Sulfat-reduzierenden Bakterien *in situ* nachzuweisen (Boetius *et al.*, 2000). Das Konsortium aus

Euryarchaeota und Sulfat-reduzierenden Bakterien ist wahrscheinlich die treibende Kraft, hinter der seit langem bekannten anaeroben Methan-Oxidation, die für die Umwandlung großer Teile des weltweiten Methans in CO₂ verantwortlich gemacht wird (Reeburgh, 1982). Diese Studie ist ein eindrucksvoller Beweis für das Potential der molekularen Ökologie.

Das Vorkommen von *Archaea* scheint also, anders als zuvor vermutet, keineswegs auf extreme (heiß, salzig, alkalisch, sauer) oder anaerobe Habitate beschränkt zu sein. Dennoch ist die ökologische Bedeutung, insbesondere der im Boden vorkommenden nicht-thermophilen *Crenarchaeota* bislang noch völlig unklar, da es zu Beginn dieser Arbeit lediglich vereinzelt Studien über nicht-thermophile *Crenarchaeota* in terrestrischen Habitaten gab (Bintrim *et al.*, 1997; Buckley *et al.*, 1998b; Sandaa *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2000).

4. Von 16S-Diversitätsstudien zur Funktion

Umweltstudien aufgrund von 16S ribosomaler RNA geben zwar Aufschluss über die Verbreitung bestimmter Organismen, nicht aber über deren Physiologie oder Abundanz. Um dieser Frage etwas näher zu kommen, bedurfte es weiterer technischer Entwicklungen. So konnten mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) erstmals unkultivierte Mikroorganismen, von denen zuvor lediglich die 16S rRNA identifiziert worden war, in ihrem Habitat sichtbar gemacht werden (Amann *et al.*, 1990; Hicks *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1993; Amann *et al.*, 1996; Snaird *et al.*, 1997). FISH bedient sich dabei der Möglichkeit, fluoreszenz-markierte Oligonukleotide an die rRNA im Organismus zu binden, und diese anschließend im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Diese Technik ermöglichte nicht nur die Visualisierung von Mikroorganismen auf Einzelzellniveau, sondern auch eine quantitative Analyse bestimmter *Bacteria* oder *Archaea* in ihrem Habitat (Neef *et al.*, 1996; DeLong *et al.*, 1999; Ravensschlag *et al.*, 2001). Eine weitere quantitative Technik, die erst seit kurzem, d.h. im wesentlichen parallel zu der vorliegenden Arbeit Anwendung in der mikrobiellen Ökologie findet, ist die quantitative *real time*-PCR (Takai and Horikoshi, 2000). Sie ermöglicht es auch, kleinste Subpopulationen (<1% der Gesamtpopulation) auf der Basis der 16S rRNA-Gene zu quantifizieren. Neben den

beschreibenden und quantifizierenden Methoden sind heute Techniken von besonderem Interesse, die zum Verständnis der Physiologie von unkultivierten Mikroorganismen beitragen. Insbesondere ist hier die Mikroautoradiographie zu erwähnen. Hierbei werden radioaktiv markierte Substrate zu einer Probe gegeben. In Kombination mit FISH kann anschließend analysiert werden, welche Organismen die markierten Substrate aufgenommen und möglicherweise umgesetzt haben (Lee *et al.*, 1999; Otte *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2002). In ähnlicher Weise können auch aktive Organismen durch den Einbau von Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) in ihre DNA von ruhenden Zellen unterschieden werden (Borneman, 1999; Urbach *et al.*, 1999).

Um Aussagen, über das physiologische Potential und die ökologische Bedeutung von nicht-kultivierten Organismen machen zu können, ist es hilfreich, Einblick in das Genom der Mikroorganismen zu erhalten. Hierzu kann man Umweltgenbanken anlegen, die einen Teil, oder unter Umständen das gesamte genetische Material einer mikrobiellen Population enthalten. Dies wurde kürzlich treffend als „Metagenom“ bezeichnet (Rondon *et al.*, 2000). Zur Erstellung solcher Genbanken wird hochmolekulare, genomische DNA aus einem Habitat isoliert und rekombinant in Cosmid-, Fosmid- oder BAC-Vektoren von *Escherichia coli* abgelegt (Abb. 4). Mittels geeigneter phylogenetischer Markermoleküle wie der 16S rRNA, können diese Umweltgenbanken nun auf Genomfragmente, der zu untersuchenden Gruppe hin durchgemustert werden. Diese Technik wurde weltweit bislang nur in einem Labor (DeLong E.F.) zur Charakterisierung von Genomfragmenten unkultivierter mariner Organismen publiziert.

Eine der Studien vergleicht die genomische Organisation des nicht-thermophilen, nicht-kultivierten, marinen *Crenarchaeoten* „*Cenarchaeum symbiosum*“ mit seinen hyperthermophilen Verwandten (Preston *et al.*, 1996). In einer Folgestudie konnten Schleper *et al.*, durch die heterologe Expression und funktionelle Charakterisierung einer DNA Polymerase B von „*Cenarchaeum symbiosum*“ erstmals zeigen, dass Proteine der nicht-thermophilen *Crenarchaeota* tatsächlich an die moderaten Temperaturen ihres Lebensraums angepasst sind (Schleper *et al.*, 1997b).

In einer anderen Umweltgenomstudie wurde ein neuer Rhodopsin-Typ, das Proteo-

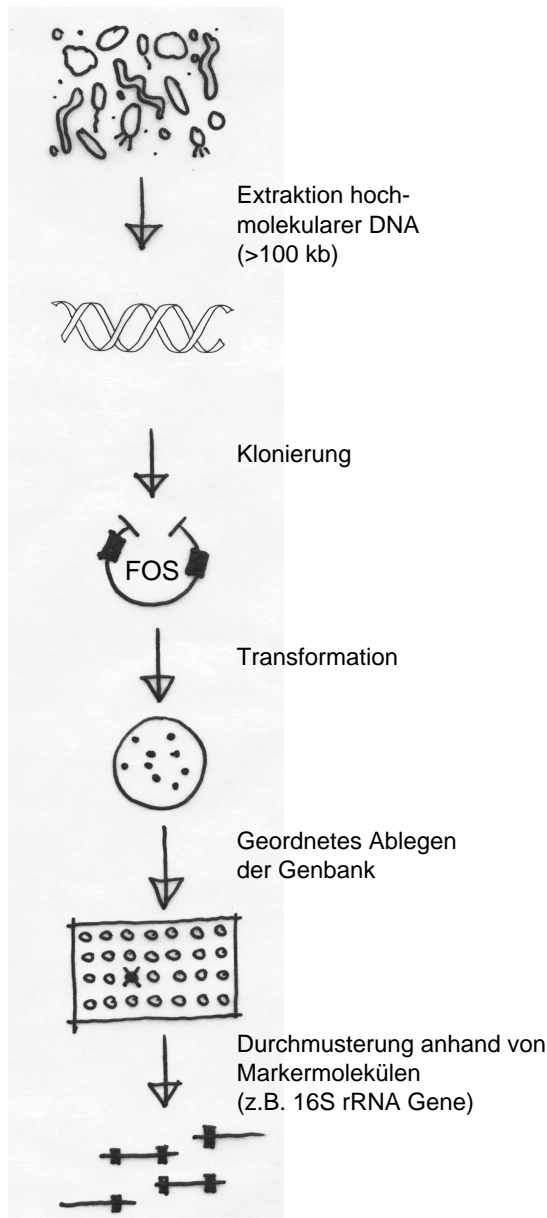


Abb. 4: Umweltgenomischer Ansatz, bei dem hoch-molekulare DNA aus Umweltproben in Fosmid, Cosmid oder Bac-Vektoren kloniert wird, um anschließend als eine geordnete Genbank abgelegt zu werden. Diese kann dann mittels Markermolekülen, wie 16S rRNA-Genen, durchgemustert werden, um genomische Information von bislang nicht kultivierten Mikroorganismen zu erhalten.

rhodopsin, das als lichtgetriebene Protonenpumpe agiert, auf einem genomischen Fragment, eines marinen, unkultivierten Proteobakteriums entdeckt (Beja *et al.*, 2000). In einer Folgestudie konnte Beja *et al.* die vorhergesagte Funktion des Proteorhodopsins, im Ozean nachweisen (Beja *et al.*, 2001).

Mit 16S rDNA-Diversitätsstudien, FISH, Microautoradiographie, *real time* PCR und Umweltgenomik, liegen jetzt Techniken bereit, die es ermöglichen, unser Verständnis der mikrobiellen Stoffkreisläufe deutlich zu erweitern.

In der vorliegenden Arbeit sollte in einem ersten Schritt die Verbreitung der nicht-thermophilen *Crenarchaeota* über 16S rDNA Diversitätsstudien von unterschiedlichen terrestrischen und aquatischen Habitaten untersucht werden. Insbesondere sollte ein Sandökosystem genauer analysiert werden. Parallel hierzu sollte die bakterielle Diversität vergleichend zu der archaealen untersucht werden. Die 16S rDNA Diversitätsstudien sollten die Basis für anschließende quantitative 16S rDNA Analysen und *in situ* Hybridisierungen bilden. Um beurteilen zu können, inwieweit sich die 16S rDNA Diversität auf genomischer Ebene nicht-kultivierter Mikroorganismen fortsetzt, sollten genomische Fragmente von nicht-kultivierten Organismen analysiert und verglichen werden.